

# **PREPARATION OF BICYCLOMYCIN**

Publication number: JP52108092 (A)

Publication date: 1977-09-10

Inventor(s): IMANAKA HIROSHI; IGUCHI HIDEKO; AOKI HATSUO +

Applicant(s): FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO +

Classification:

- international: C12P1/06; C12P17/18; C12R1/465; C12P1/06; C12P17/18;  
(IPC1-7); C12D9/14


- European:

Application number: JP19760025927 19760309

Priority number(s): JP19760025927 19760309

Also published as:

 JP60040838 (B)

 JP1315247 (C)

Abstract of JP 52108092 (A)

PURPOSE: Known antibiotic bicyclomycin is produced by the cultivation of a novel variation belonging to Streptomyces species.

.....  
Data supplied from the *espacenet* database ---- Worldwide

## ⑫ 公開特許公報 (A)

昭55—156592

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 1/06  
// C 12 R 1/01

識別記号  
庁内整理番号  
6760—4B

⑬ 公開 昭和55年(1980)12月5日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

## ⑭ 抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

静岡県田方郡大仁町三福685

⑯ 特 願 昭54—60021

⑰ 発 明 者 児玉章

⑱ 出 願 昭54(1979)5月15日

静岡県田方郡函南町平井1900の  
3

⑲ 発 明 者 藤井忠代  
三島市光ヶ丘15の4

⑲ 発 明 者 小谷勝

⑲ 発 明 者 里井秀三  
静岡県田方郡函南町柏谷1277の  
28

静岡県田方郡大仁町田京727の  
3

⑲ 発 明 者 武藤直紀

⑳ 出 願 人 東洋醸造株式会社  
静岡県田方郡大仁町三福632の  
1

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

## 2. 特許請求の範囲

(1) グクテロスピランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンC1aを採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

(2) グクテロスピランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌が、グクテロスピランジウム・タイランゲンセ G 367である特許請求の範囲第1項記載の抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

## 3. 発明の詳細を説明

本発明は、抗生物質ゲンタミシンC1a (Gentamicin C1a) の新規な製造法に関する。

従来より抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌としては、ミクロモノスポラ・プルプレア (Micromonospora purpurea; 特公昭44—21394号、

米国特許第3091572号、Antimicrob. agents and chemother. 1963 No. 1, 8, 14, 17および(116)、ミクロモノスポラ・エチノスポラ (Micromonospora echinospora) およびその2変種(上記同一文献)、ミクロモノスポラ・セガミエンス (Micromonospora segamiensis) およびその2変種(特開昭49—42888号)、およびミクロモノスポラ・プルプレア・バリエスタ・ミグレッツェンス (Micromonospora purpurea var. nigrescens) ハンガリー国特許第148778号、J. Antibiot. 30: 945 (1977) が知られていた。上記の通り、抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌は、すべてミクロモノスポラ属 (Micromonospora) に属するものであり、その形態的特徴は基生菌糸に個々の胞子を形成するものであり、さらにミクロモノスポラ属はミクロモノスポラ科 (Micromonosporaceae) に属するものであった (Bergey's manual of determinative bacteriology 第8版 (1974))。

本発明者らは、静岡県富士市の畑土壌より分離

した放線菌G 3 4 7株が抗生物質ゲンタミシンGに  
を産生することを見出し、後述する通り、放線  
菌G 3 4 7株がダクタロスポランジウム属(  
Dactylosporangium)に属するもので、その形態  
的特徴は基性菌糸に胞子のうを産生し、胞子のう  
中に鞭毛を有する胞子を形成するもので、さらに  
このダクタロスポランジウム属はアクチノプラネ  
ス科(Actinoplanaceae)に属するもので、従来  
のクロモノスポラ属とは分類学上、明らかに科  
の段階での相違が認められるもので、抗生物質ゲ  
ンタミシンGの新規な生産菌であることを見い  
出した。

また上記の放線菌G 3 4 7株の菌学的諸性状は  
次の通りである。

#### 〔I〕 形態的性状

リンゴ酸カルシウム寒天培地〔Bact. Rev. 2.1  
: 1 (1957)〕上、30℃、3-7日間培養  
し、観察した所見は次の通りである。

基性菌糸は曲線状または屈曲状で、分枝ををし  
て伴走し、分断せず、直径0.5-0.8μであり、

- 3 -

気菌糸は形成しない。

基性菌糸に、大きさ1.5-2.0×2.5μの球状  
または楕円状物体の着生が、寒天培地中に随つた  
状態でみられる。

基性菌糸より短かい胞子のう柄を生じ、胞子の  
うは指形で、寒天培地表面上に、1個または房状  
に形成する。胞子のうの大きさは、1.0-1.5×  
4.0-6.5μで、中に3-4個の胞子がたてに一  
列に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、楕円形  
または棒状形を呈し、大きさは1.0-1.5×1.5  
-2.5μであり、単性で房状の鞭毛を有している。

#### 〔II〕 アミノピメリン酸組成

全菌体分析によるシアミノピメリン酸は、ノゾ  
ン型およびノゾン型よりR<sub>m</sub>値の低いもの(celow,  
moving diaminopimelic acid)が検出された。

#### 〔III〕 各種培地における生育状態等

各種培地上で、30℃、14日間培養し、観察  
した所見は次の通りであり、オート・ミール寒  
天培地上で未発育の気菌糸がわずかに形成される

- 4 -

以外に、気菌糸の形成は認められず、また胞子の  
うはリンゴ酸カルシウム寒天培地上で良好、土壌  
寒天培地〔Jgen. Microbiol. 5.0: 295 (19  
68)〕上で、中程度であり、その他の培地上で  
はわずかに、またほとんど形成されなかつた。

なお、色の表示は、カラー・ハーモニー・マニ  
アル( Color Harmony Manual) 第4版1956年  
( Container Corporation of America )による  
色の分類に従ったものである。

各種増地土における生育状態等

増地	生育	増地菌系の色	可溶性色素
シュクコース・熱帯増地増地 (ワツクスマン増地増地1)※	中程度ないし不良	アブリコット[Apricot(43a)]とダステイ・オレンジ [Dasty Orange(41c)]	なし
グルコース・アスパラギン増地増地 (ワツクスマン増地増地2)※	不良	ブライト・メロン・イエロー[Brite Melon Yellow (31a)]をいしアブリコット(41a)	"
グリセリン・アスパラギン増地増地 (ISP増地5)※※	僅少ないし不良	無色ないしライト・メロン・イエロー[Light Melon Yellow(3aa)]	"
スターチ・無増地増地増地 (ISP増地4)※※	中程度ないし良好	ルセツ・オレンジ[Russet Orange(4aa)]をいし ダステイ・オレンジ(41c)	"
チロシン増地増地 (ISP増地7)※※	僅少ないし不良	アブリコット[Apricot(4ga)]をいしペール・パステル オレンジ[pale Pastel Orange(41c)]	"
オート・ミール増地増地 (ISP増地5)※※	中程度ないし良好	オレンジ・ラスト[Orange Rust(4pe)]をいし ルセツ・オレンジ[Russet Orange(4pe)]	"
イースト・エキスを増地増地増地 (ISP増地2)※※	"	メイプル[Maple(41e)]をいしルグヅ・タン [Luggage Tan(4ne)]	メイプル(41e)をいしライト・ ブラウン[Light Brown(4ng)]
リンゴ酸カルシウム増地増地	不良	無色	なし
栄養増地増地 (ワツクスマン増地増地14)※	僅少	"	"

- 6 -

メネント増地増地 (ワツクスマン増地増地30)※	中程度ないし良好	メイプル(41e)をいしルグヅ・タン(4ne)	メイプル(41e)をいしライト・ブラウン (4ng)
エマーゾン増地増地 (ワツクスマン増地増地28)※	中程度	パステル・オレンジ(41c)をいしメイプル(41e)	メイプル(41e)
ハイキート・トレスナー増地増地 (ワツクスマン増地増地32)※	中程度ないし良好	シナモン[Cinnamon(51e)]をいしメイプル (41e)	メイプル(41e)をいしライト・スパイス・ ブラウン[Light Spice Brown (41g)]
グルコース・イースト・エキスを増地増地 (ワツクスマン増地増地29)※	中程度	メロン・イエロー[Melon Yellow(3ga)]	なし
ペプトン・イースト・エキスを増地増地 (ISP増地6)※※	僅少	無色	"
土壌増地増地	僅少ないし不良	"	"
ジャガイモ片 (ワツクスマン増地増地45)※	中程度	タイレルズド[Tyler Red(51e)]をいし銅 [Copper(51c)]	"
ジャガイモ片+炭酸カルシウム	"	"	"
ニンジン片	僅少	無色	"

※ Wakeman, S. A. The Actinomyces 1961 P. 327-334 Williams & Wilkins co.  
 ※ Inter. J. Syst. Bact. 16: 313-340 (1966)  
 ※ Antimicrob. Agents and Chemother 1963 P. 116-124

- 7 -

## 〔Ⅳ〕生理的性状

生理的諸性状は下記の通りである。

## (1) 炭素源の同化性

炭素源	P & G 系	L 系
D-アラビノース	±	+
L-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	—	—
L-イノシトール	—	—
D-マンノース	+	+
D-マンニトール	+	+
α-ソリビトール	+	+
β-ラクトース	+	±
ズルシトール	—	—
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレジトース	+	+
ラフィノース	+	—

L-ラムノース	+	+
D-リボース	—	—
L-ソルボース	—	—
D-ソルビトール	—	—
シュクロース	+	+
D-キシロース	+	+
アデニトール	—	—
ザリシン	±〜+	±〜+
スターチ	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	+	+
イタリン	—	—

+: 陽性、±: 疑陽性、—: 陰性

※: ブリドハム・ゴットリブの無機塩培地

※※: Inter. J. Syst. Bact. 21: 240—2

47 (1971) によるルエドマンの有機培地

2) 生育温度範囲: 20〜40℃

3) 脱脂牛乳: ペプトン化および凝固とともに凝性

— 8 —

— 9 —

4) ノラニン様色素の生成: 陰性 (チロシンおよびペプトン・イーストエキス・鉄寒天培地上)

5) スターチの加水分解: 陽性

6) セルロースの分解: 陽性

7) カゼインの分解: 陽性

8) チロシンの分解: 陽性

9) セラチンの液化: 陽性

10) 硫化水素の生成: 弱い陽性

11) 硝酸塩の還元: 陽性

12) 生育 PH: PH 5.5〜7.0

上記の通り、本菌 G 367 の特徴としては、寒生菌糸に指形の胞子のうを着生し、胞子のう中に胞子がたてに一列にならび、胞子に房状の鞭毛を有していることにある。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛を有する胞子を形成するものは、アクチノプラネス科 (Actinoplanaceae) に属するものであつて、胞子のうが指形で、その中にたてに一列に胞子が形成されるものは、ダクテロスポランジウム属に属する。

さらに、本菌 G 367 株は有機培地上で、菌糸菌糸が微褐色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色素を生ずる特徴を有することより、ダクテロスポランジウム・タイランゲンセ (*Dactylosporangium thelandense*) [Arch. Microbiol. 58: 42—52 (1967)] に属するものと同定した。

よつて、本菌 G 367 を、ダクテロスポランジウム・タイランゲンセ G 367 と命名したもので、また本菌は工業技術院微生物工業技術研究所に「申請書受理番号第 4840 号」として申請されている。

本発明は上記の知見に基づいて完成されたもので、ダクテロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシン C1a 生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシン C1a を採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシン C1a の製造法である。

まず本発明を実施するに際し使用されるダクテロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシン C1a (以下単に、ゲンタミシン C1a という) の

— 10 —

— 11 —

生産菌としては、上記のダクテロスポランジウム・タイランアンセ 0367株がその一例として挙げられるもので、また本発明の使用菌はこれに限定されるものでなく、ダクテロスポランジウム属に属するゲンタミシンC1a生産菌であればよく、天然または変異株も使用し得る。

次いで、本発明のゲンタミシンC1aを製造するにあつて併示すれば、上記のダクテロスポランジウム属に属するゲンタミシンC1a生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地成分を含む培地にて好氣的に培養することによつて得られる。培地としては、固型培地または液体培地が用いられるが、特に大量生産のためには液体培地、特に水性培地が適当である。

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シクロコース、マルトース、スターチ、デキストリン、モラフセなどが使用される。栄養源としては利用可能な窒素化合物であればよく、

— 12 —

である。また生産されたゲンタミシンC1aはバブルス・ズプテリスPC1219を被検菌として、通常の寒天板法により活性区分の確認、および定量を行なつたものである。

ゲンタミシンC1aの分離精製手段の一例を示すと次の通りである。すなわちゲンタミシンC1a生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形分を除去して培養液を得るのであるが、ゲンタミシンC1aがアミノ糖化合物であるためにその培養物のPHを一旦酸性に調整し、これを中和して蒸過してその培養液を得ることが好ましく、次いでこの培養液を陽イオン交換樹脂例えばアンバーライトMB3混合床(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、これにより活性物質を2Nアンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を濃縮した後、そのPHを調整し、陽イオン交換樹脂例えばCM-セファデックスC-25(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0.5Nの濃度勾配をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性成分を

— 14 —

例えばコーン・スターチ・リカー、大豆粉、結実粉、小麦グルテン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、硝酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの塩類が必要に応じて使用される。

培養温度は菌が発育し、ゲンタミシンC1aを生産する範囲内で適宜変更し得るが、共に好ましくは25〜35℃である。培養時間は、条件によつて多少異なるが、通常100〜200時間程度であつて、ゲンタミシンC1aが最高力価に達する時期を見計つて適当な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたゲンタミシンC1a生産菌の液体培養の培養物中において、ゲンタミシンC1aは液体部分に大部分産生されている。

次いでこのゲンタミシンC1a生産菌の培養物からゲンタミシンC1aを採取するのであるが、ゲンタミシンC1aは水溶性の塩基性アミノ糖化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便

— 13 —

で、これを減圧濃縮し、凍結乾燥することによりゲンタミシンC1aの精製白色粉末を遊離塩基の型にて得られる。またこのようにして得られるゲンタミシンC1aは薄層クロマトグラフィーにてムーソポイントを示すものであることが簡便になし得る。

次いでこのようにして得られた本発明のゲンタミシンC1aの物理化学的性状を挙げれば次の通りである。

## 分子重

449 (マスマクトルより)

## 分子式

C18 H39 N5 O7

## 比旋光度

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +96.2 (C = 0.39, H<sub>2</sub>O)

## 薄層クロマトグラフィー

クロロホルム：メタノール：17%アンモニア水(2：1：1) R<sub>f</sub> = 0.22プロパノール：ピリジン：酢酸：水(6：4：1：5)上層液 R<sub>f</sub> = 0.29

## 色性状

— 15 —

## 白色粉末

上記の性状、さらにマスマスペクトルの各ピーク、核磁気共鳴スペクトルなどより、本発明により得られる化合物が、前記の文献記載のゲンタミシンC1aと同一物質であると同定された。

次に本発明の実施例を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより何ら限定されるものではない。

## 実施例1

デキストリン1%、グルコース1%、カゼイン水解物0.5%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム0.1%を含有する培地(PH7.0)100mlを500ml容三角フラスコに分別し、120℃、20分間加熱殺菌した。本培地10本に、各4ダクタロスギランジウム・タイランゲンセ6367株の斜面培養液よりの一白金耳を接種し、30℃、120時間培養した。次いでこれを上記と同一組成の加熱殺菌した培地20mlを含有する30ml容ジャーファーマンダーに移し、30℃、72時間、300rpm、毎分20mlの無菌空気の条件下で通気攪拌培養した。次いでデキストリン5%、グルコース0.5%、炭酸カルシウム0.7%、塩化コバルト1.5ppmを含有する加熱殺菌した培地(PH7.2)200mlを含有する250ml容タンクに上記の培養物10mlを移植し、30℃、120時間、250rpm、毎分100mlの無菌空気の条件下で通気攪拌培養し、培養物約190mlを得た。

条件で通気攪拌培養した。次いでデキストリン5%、グルコース0.5%、炭酸カルシウム0.7%、塩化コバルト1.5ppmを含有する加熱殺菌した培地(PH7.2)200mlを含有する250ml容タンクに上記の培養物10mlを移植し、30℃、120時間、250rpm、毎分100mlの無菌空気の条件下で通気攪拌培養し、培養物約190mlを得た。

次いで、実施例2の如くして、その培養物よりゲンタミシンC1aを分離精製するものである。

## 実施例2

実施例1で得られた培養物を、12N炭酸水溶液にてPH2に調整し、30分間攪拌した後、薄アンモニア水にてPH7.0に調整し、さらにこれに浮遊助剤としてペーライト(商品名)4gを加えて予濾し、次いで得られた培養液を、アンバーライトIRC-50(ローム・アンド・ハース社製)(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型)10mlを充填したカラムにチャージし、水洗した後、2Nアンモニア水が20mlにて溶出せしめ、その全溶出液を得て、これを

- 16 -

- 17 -

100mlまで減圧濃縮した。

次いでこの濃縮液を6N炭酸水溶液にてPH7.0に調整し、これを、CM-セファデックスG-25(フアルマン・フアイン・ケミカル社製)(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型)500mlを充填したカラム(径4cm)にチャージして活性物質を吸着せしめた。その後該カラムを水洗後、0~0.35Nの濃度勾配をもたせたアンモニア水5mlにより溶出せしめ、溶出液を20mlずつ分画した。各分画について、クロロホルム：メタノール：2.8%アンモニア水=1:1:1の下層を展開溶媒とした薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン発色により目的物を確認した。その結果、第235分画より245分画がゲンタミシンC1aのみを含有したものであつた。次いでこの分画を回収、合せて減圧濃縮し、次いで凍結乾燥してゲンタミシンC1a85mgを得た。

特許出願人 東洋薬造株式会社  
代表者 伊東富士馬

- 18 -

## 手 続 補 正 書

昭和55年 補正 第 1 号

特許庁長官 川 部 龍 雄 殿

## 1. 事件の表示

昭和54年特許第4002/号

## 2. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンC1aの製法

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 静岡県田方郡大仁町三橋632の1

名称 東洋薬造株式会社

代表者 伊東富士馬

## 4. 補正命令の日付

自発

## 5. 補正の対象

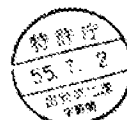
明細書の発明の詳細な説明の欄

## 6. 補正の内容

明細書第4頁第16行の

「diaminopimellile」を

「diaminopimelle」と訂正する



同第18頁第3行の  
「セファデックス9」を  
「セファデックス0」と訂正する